黔产钩藤茎、叶化学成分及抗肿瘤活性研究

刘扬[1,2]，张妮[1,2]，罗俊[2,3]，王苗苗[2,3]，潘卫东[1,2*]

（1. 贵州医科大学，省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室，贵阳 550014； 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室/贵州省天然药物工程研究中心，贵阳 550014；3. 贵州中医药大学，贵阳 550025）

摘 要：钩藤富含生物碱类成分且资源丰富，具有清热平肝，息风定惊等作用。目前对钩藤茎、叶的化学成分及生物活性方面的报道较少，为了明确钩藤茎、叶的物质基础，以及为该植物资源的合理开发与可持续利用提供科学依据。该文研究了钩藤茎、叶的化学成分及抗肿瘤活性的筛选。采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 及半制备 HPLC 等色谱技术进行分离纯化，根据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构；采用 MTT 法对人白血病细胞株 K562 、HEL 进行体外抗肿瘤活性筛选。从钩藤茎中分离得到 7 个化合物，分别鉴定为 3,4,5-三甲氧基苯酚（**1**），东莨宕素（**2**），异去氢钩藤碱（**3**），去氢钩藤碱（**4**），Vallesiachotamine（**5**），钩藤碱（**6**），异钩藤碱（**7**）。从钩藤叶中分离得到 12 个化合物，分别鉴定为二十八烷醇（**8**），*β*-谷甾醇（**9**），三十烷酸（**10**），2-methyl-5,7-dihydroxy-chromone-7-*O*-*β*-D-glucopyranoside（**11**），齐墩果酸（**12**），槲皮素（**13**），常春藤苷元（**14**），山柰酚（**15**），(6R, 9R)-9-hydroxymegastigman-4-en-3-one（**16**），熊果酸（**17**），表儿茶素（**18**），大黄素甲醚（**19**）。结果表明：化合物 **3** 和 **5** 对 HEL 细胞有抑制作用，IC_{50} 值分别为 17.96 μg·mL^{-1} 和 73.01 μg·mL^{-1}。化合物 **5** 对 K562 细胞有抑制作用，IC_{50} 值为 16.45 μg·mL^{-1}。其中，化合物 **1**, **8**, **10**, **16** 为首次从钩藤植物中分离得到，钩藤茎化学成分有一定的抗肿瘤活性。

关键词：钩藤，化学成分，分离纯化，结构鉴定，抗肿瘤活性

中图分类号：Q946.91　　　　**文献标识码：**A

Chemical constituents of stems and leaves from *Uncaria rhynchophylla* in Guizhou and their antitumor activities

LIU Yang[1,2], ZHANG Ni[1,2], LUO Jun[2,3], WANG Miaomiao[2,3], PAN Weidong[1,2*]

(1. *State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University*, Guiyang 550014, China; 2. *The Key Laboratory of Chemistry for Natural Product of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences/Guizhou Provincial Engineering Research Center for Natural Drugs*, Guiyang 550014, China; 3. *Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*, Guiyang 550025, China)

Abstract: *Uncaria rhynchophylla* contains large amounts of alkaloids and abounds in natural resources, which has the the function of heat-clearing for calming liver and wind-calming for

基金项目：国家自然科学基金（81660580）；贵州省科技支撑项目（黔科合支撑[2019]2757 号）；贵州省中药材现代农业产业技术体系建设项目（GZCYTX2015-0202） [Supported by the National Natural Science Foundation of China（81660580）; the Science and Technology Department of Guizhou Province, China (QKHZC[2019]2757; Construction Project of Modern Agricultural Industry Technology System of Traditional Chinese Medicinal Materials in Guizhou Province（GZCYTX2015-0202）]。

作者简介：刘扬(1995-)，女，黑龙江伊春人，硕士，药物化学，研究方向为天然药物化学，（E-mail）1307930847@qq.com。

通信作者：潘卫东，博士，研究员，天然产物化学研究，（E-mail）wdpan@163.com。

calming frightened. In this paper, the chemical constituents of stems and leaves from *Uncaria rhynchophylla* and their antitumor activities were studied. The extracts were isolated and purified by using silical gel, Sephadex LH-20, semi-HPLC, the structures of the compounds were identified by physicochemical property and spectrum analysis. The antitumor activities of chemical constituents against K562, HEL cell lines were assessed by MTT method. Seven compounds were isolated and identified from stems of *Uncaria rhynchophylla* as: 3,4,5-trimethoxyphenol (**1**), scutellarin (**2**), isohydrohydrogenine (**3**), dehydroramine (**4**), Vallesiachotamine (**5**), rhynchophylline (**6**), isorhynine (**7**). Twelve compounds were isolated and identified from leaves of *Uncaria rhynchophylla* as: octadecanol (**8**), *β*-sitosterol (**9**), tridecanoicacid (**10**), 2-methyl-5,7-dihydroxy-chroone-7-*O*-*β*-D-glucopyranoside (**11**), oleanolic acid (**12**), quercetin (**13**), ivy aglycone (**14**), kaempferol (**15**), (6R, 9R)-9-hydroxymegastigman-4-en-3-one (**16**), ursolic (**17**), epicatechin (**18**), emodin methylether (**19**). The results of antitumor activities showed that compound **3** and **5** inhibited the activities of HEL cell lines, IC_{50} values were 17.96 μg mL^{-1} and 73.01 μg mL^{-1}. Compound **5** inhibited the activities of K562 cell lines, IC_{50} values were 16.45 μg mL^{-1}. Compounds **1**, **8**, **10** and **16** were isolated from this plant for the first time. Some compounds from stems of *Uncaria rhynchophylla* have certain antitumor activities.
Key words: *Uncaria rhynchophylla*, chemical constituents, isolation and purification, structure identification, antitumor activity

钩藤，是茜草科植物钩藤（*Uncaria rhynchophylla*）、大叶钩藤（*U. macropylla*）、毛钩藤（*U. hirsute*）、华钩藤（*U. sinensis*）或无柄果钩藤（*U. sessilifucus*）的干燥带钩茎枝，常用以眩晕欲仆、癫痫抽缩、高烧惊厥、伤风夹惊、儿童惊啼、受孕子痫等症状（国家药典委员会，2015）。其主要产自于我国的赣、粤、桂、湘、滇、黔等省份（Gao et al., 2017）。钩藤作为贵州省的道地药材之一，在贵州的剑河、丹寨、锦屏、榕江、开阳等 30 多个县市均有种植（Yang et al., 2014）。

钩藤的化学成分类型较为多样，包括生物碱类、黄酮类、三萜类、甾醇类、多酚类、挥发油类以及糖苷类等（Wang & Sun，2010；Zhang & Huang，2020）。其中，生物碱类为钩藤最主要的有效成分，按照结构类型可进一步分成吲哚类以及氧化吲哚类两大类（Cai et al., 2019）。前人对其药用部位研究比较多，而对于非药用部位报道较少，为了更进一步开发利用，避免资源的浪费，本文针对钩藤非药用部位茎、叶化学成分展开了初步的探究，从钩藤的茎里总共分得了 7 个化合物（图 1），分别鉴定为 3,4,5-三甲氧基苯酚（**1**），东莨宕素（**2**），异去氢钩藤碱（**3**），去氢钩藤碱（**4**），Vallesiachotamine（**5**），钩藤碱（**6**），异钩藤碱（**7**）。从钩藤的叶中总共分得了 12 个化合物，分别鉴定为二十八烷醇（**8**），*β*-谷甾醇（**9**），三十烷酸（**10**），2-methyl-5，7-dihydroxy-chromone-7-O-β-D-glucopyranoside（**11**），齐墩果酸（**12**），槲皮素（**13**），常春藤苷元 （**14**），山柰酚（**15**），(6 R，9 R)-9-hydroxymegastigman-4-en-3-one（**16**），熊果酸（**17**），表儿茶素（**18**），大黄素甲醚（**19**）。化合物 **1**， **8**，**10**，**16** 为首次从该植物中分离得到。抗肿瘤活性结果表明，化合物 **3** 和 **5** 对 HEL 细胞的抑制作用较强。化合物 **5** 对 K562 细胞的抑制作用较强。本研究丰富了钩藤的化学物质基础，也为更加全面系统地开发以及合理利用钩藤资源提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

仪器：INOVA – 400 MHz 核磁共振波谱仪（美国 Varian 公司，WIPM – 500 MHz 核磁共振仪（中科院武汉数学物理研究所），600 MHz 超导核磁共振波谱仪（德国布鲁克公司），

Waters 2545 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司），美国 HP-5973 型质谱仪，HP1100-MSD 型液质联用仪，Sephadex LH - 20 凝胶（40 ~ 70 μm, 默克），混匀机（IKA 公司），冻存管（Corning）细胞培养皿（NEST），超低温冰箱（Thermo 公司），细胞培养箱（Thermo 公司），96 孔板（NEST），超净工作台（Thermo 公司），荧光倒置显微镜（Zeiss 公司），Fetal bovine serum（Hyclone），控温摇床（IKA 公司），Milli - Q 超纯水仪（Millipore 公司），水浴锅（Grant 公司)，DEME。柱层析硅胶（200 ~ 300 目和 300 ~ 400 目），薄层层析硅 GF254（0.20 ~ 0.25 μm）（青岛海洋化工工厂），Sephadex LH-20 （MERCK 公司），低温离心机（BECKMAN 公司），细胞培养瓶（NEST），超净工作台（Thermo 公司），移液管（Fischer)，离心管（NEST），细胞培养皿（NEST），高压灭菌锅（上海申博化工有限公司）

试剂：甲醇、乙醇、石油醚（上海泰坦科技股份有限公司），多功能酶标仪（Gene 公司），Trypsin（Gibico），双抗（青霉素+链霉素），MTT（Sigma)，MCI GEL CHP20P（日本三菱化学公司）。

材料由贵州省丹寨县兴仁镇昌昊金煌（贵州）中药有限公司种植基地提供，经贺定翔中药师鉴定为茜草科，钩藤属，钩藤(*Uncaria rhynchophylla*)的茎枝及叶。

1.2 提取与分离

干燥钩藤的茎 15.0 kg，粉碎后用浓度为 90%的乙醇（每次 50 L）加热回流提取 3 次，合并提取液，减压蒸馏浓缩除去有机溶剂后得粗提物。用浓度为 5%的盐酸溶解浸膏，过滤得到滤液，用饱和氢氧化钠溶液调节滤液的 pH，使其至 pH = 9，然后分别用氯仿萃取 4 次，合并氯仿层，减压回收溶剂，得氯仿层 200.0 g。取氯仿部位浸膏 200.0 g，加适量溶剂溶解，用（60~80 目），质量约为 350.0 g 的硅胶拌样，再经硅胶（300~400 目），质量约为 2.0 kg，进行柱层析，用（氯仿－甲醇 100: 1 → 0 : 1）进行梯度洗脱。每次接馏分约为 800 mL，减压浓缩回收溶剂。将浓缩后的组分用薄层色谱（TLC）展开，分别观察组分在紫外灯下的荧光显色和浓度为 5%磷钼酸的显色情况，并合并相似的部分，一共分成 9 段（Fr.1~ Fr.9）。第 Fr.2 段(5.0 g)经 MCI 柱层析(甲醇－水 20 : 80 → 100 : 0)洗脱分为 6 段。Fr.2-1(505.2 mg）反复经过硅胶柱梯度洗脱（石油醚－乙酸乙酯 10 : 1 → 1 : 1），得化合物 1（6.0 mg）和 2（7.0 mg）。将 Fr.2-6（240.3mg）进行重结晶后得化合物 3（5.0 mg）。将 Fr.2-5（1.3 g）部分经过反复硅胶柱层析及半制备高效液相色谱分离后得化合 4（3.2 mg）和 5（6.0 mg）。将 Fr.3（4.0 g）经 Sephadex LH-20 凝胶柱（甲醇－水 1 : 1）、硅胶柱梯度洗脱（石油醚－乙酸乙酯 8 : 1 → 2 : 1）的过程，再经过半制备高效液相分离，得化合物 6（15.3 mg）和 7（4.0 mg）。

干燥钩藤的叶 7.5 kg，粉碎后，同样用 90% 的乙醇（每次 25 L）回流提取 3 次，再合并提取液。减压蒸馏浓缩除去有机溶剂后得粗提物，将得到的总浸膏加入适量的水混悬。依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次，再减压回收溶剂。分别获得石油醚部位浸膏（5.0g），乙酸乙酯部位浸膏 291.0 g，正丁醇部位浸膏 330.0 g。称取钩藤叶乙酸乙酯部位的浸膏（291.0 g），加入适量的有机溶剂，使其充分溶解，再称量（60~80 目）硅胶约为 500.0 g 拌样，再称量（300 ~ 400 目）的硅胶约 3 kg 进行柱层析分离，用（氯仿−甲醇 100 : 1 → 0 : 1）进行梯度洗脱。每次接馏分约为 800 mL，减压浓缩，再用薄层色谱展开。将相似组分合并。将氯仿的萃取部分总共分成 11 段（Fr.1~ Fr.11)。把第 Fr.3 段（3.0 g）经 MCI 柱层析（甲醇－水 20 : 80 →100 : 0）洗脱。共分为 6 段。把 Fr.3-1（820.1 mg）段用硅胶柱洗脱（石油醚－乙酸乙酯 20 : 1→ 5 : 1），得化合物 8（20.0 mg），9（15.2 mg）。把第 Fr.4 段（6.0 g）经硅胶柱梯度洗脱（石油醚－乙酸乙酯 100 : 1→ 10 : 1），共分为 7 段（Fr.4-1–Fr.4-7）。将 Fr.4-5（1.5 g）段经硅胶柱洗脱（石油醚—乙酸乙酯 10 : 1)，得化合物 10（8.0 mg），11

（5.0 mg）。将 Fr.4-7（602.4 mg），经甲醇重结晶，得化合物 12（6.1 mg）。将 Fr.6 段（5.0 g）经硅胶柱梯度洗脱（石油醚 - 乙酸乙酯 50 : 1→ 10 : 1），共分为 9 段（Fr.6-1–Fr.6-9）。将 Fr.6–4（1.6 g）段经 Sephadex LH-20 凝胶柱（甲醇 – 氯仿 1 : 1）洗脱，得到化合物 13（6.3 mg）。将 Fr.6–9（803.2 mg）段经 Sephadex LH-20 凝胶柱（甲醇 – 氯仿 1 : 1）洗脱，后经高效液相半制备分离，得化合物 14（6.3 mg），15（6.2 mg）和 16（3.0 mg）。将 Fr.7 段（6.0 g）经 MCI 柱层析（甲醇 – 水 30 : 70→ 100 : 0）后，再通过反复硅胶柱梯度洗脱（石油醚 – 乙酸乙酯 20 : 1→ 0 : 1）和 Sephadex LH-20 凝胶柱（50% 甲醇)分离以及半制备高效液相分离，得化合物 17（25.1 mg），18（20.3 mg），19（8.2 mg）。

1.3 抗肿瘤活性实验

采用 MTT 法测定钩藤茎、叶中化合物对人白血病细胞株（K562）、（HEL）的增殖抑制作用。选用对数期细胞，选用 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基配制细胞悬液。接种于 96 孔板，使每孔细胞为 8 000 个，将 96 孔板置于 5% CO_2 培养箱中，过夜，待细胞完全适应环境。将待测化合物用 DMSO 配成 5 个浓度梯度的培养基。阳性对照用紫杉醇，阿霉素，长春新碱，顺铂和 5-氟尿嘧啶配置成等浓度梯度。阴性对照为等体积 0.25% DMSO 的培养基，每组设 5 个复孔。加药后，培养 48 h。离心去除上清液，加入 5 mg•mL^{-1}MTT 的培养基。在 37 ℃，5% CO_2 培养箱中孵育 4 h。取出 96 孔板，弃除上清液，加入 DMSO，恒温摇床 37 ℃ 避光，至甲瓒晶体充分溶解。于酶标仪 490 nm 处，测 OD 值。细胞存活率（%）=（实验组 OD－空白对照组 OD）/（对照组 OD－空白对照组 OD）×100%，抑制率（%）=100%－细胞存活率（%）；半数抑制浓度 $IC_{50} = \lg^{-1[Xm-i\times(\sum p-0.5)]}$，式中：*i* 表示(最大剂量/相邻剂量)的对数值；*Xm* 表示最大浓度对数值；$\sum p$ 表示各浓度抑制率之和。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 **1**：白色无定形粉末。ESI-MS *m/z*: 207 $[M + Na]^+$, ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 6.09 (2H, s, H-2, 6), 3.81 (6H, s, 3, 5-OCH_3), 3.78 (3H, s, 4-OCH_3). ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 153.8 (C-3, 5), 152.3 (C-1), 131.9 (C-4), 92.9 (C-2, 6), 61.1 (4-OCH_3), 56.0 (3, 5-OCH_3)。以上数据与文献（DE Oliveira et al., 2014）对照基本一致，故鉴定该化合物为 3,4,5-三甲氧基苯酚。

化合物 **2**：白色粉末。ESI-MS *m/z*: 215 $[M + Na]^+$, ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7.60 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 6.92 (1H, s, H-5), 6.85 (1H, s, H-8), 6.27 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 3.96 (3H, s, 6-OCH_3)。^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 161.5 (C-2), 149.7 (C-6, 9), 144.0 (C-7), 143.3 (C-4), 113.4 (C-5), 111.5 (C-3), 107.5 (C-10), 103.2 (C-8), 56.4 (6-OCH_3)。以上数据与文献（Ma et al., 2009）对照基本一致，故鉴定该化合物为东莨宕素。

化合物 **3**：白色粉末，以碘化铋钾显色，呈阳性反应。ESI-MS *m/z*: 383 $[M + H]^+$, ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 8.44 (1H, s, 1-NH), 7.47 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-9), 7.28 (1H, s, H-17), 7.17 (1H, m, H-11), 7.05 (1H, t, *J* = 7.1 Hz, H-10), 6.89 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-12), 5.52 (1H, m, H-19), 4.94 (2H, m, H-18), 3.70 (3H, s, OCH_3), 3.58 (3H, s, $COOCH_3$), 3.31 (1H, m, H-3), 3.21 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-15), 2.07-1.97 (2H, m, H-6a,6),1.08 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-14a)。^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 184.3 (C-2), 170.8 (C-22), 162.0 (C-17), 142.5 (C-19), 142.1 (C-13), 136.4 (C-8), 130.0 (C-11), 127.7 (C-9), 124.9 (C-10), 117.9 (C-18), 114.5 (C-16), 111.8 (C-12), 74.6

(C-3), 63.8 (C-21), 61.2 (C-OCH_3), 59.3 (C-7), 56.5 (C-5), 53.5 (C-$COOCH_3$), 45.0 (C-20), 40.1 (C-15), 38.0 (C-6), 32.1 (C-14)。以上数据与文献（Kim et al., 2011）对照基本一致，故鉴定该化合物为异去氢钩藤碱。

化合物 **4**：白色粉末，以碘化铋钾显色，呈阳性反应。ESI-MS *m/z*: 383 $[M + H]^+$, ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 8.20 (1H, s, 1-NH), 7.27 (1H, s, H-17), 7.23 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-9), 7.04 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-10), 6.87 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-12), 5.51 (1H, m, H-19), 4.99～4.85 (2H, m, H-18), 3.73 (3H, s, OCH_3), 3.62 (3H, s, $COOCH_3$), 3.39 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, H-3), 3.28 (1H, dd, *J* = 10.8, 4.0 Hz, H-15), 3.00 (1H, m, H-20), 2.07～1.98 (2H, m, H-6a, 6b), 1.90 (1H, m, H-14b), 1.24 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-14a). ^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 181.2 (C-2), 159.7 (C-17), 140.8 (C-19), 139.5 (C-13), 133.7 (C-8), 127.9 (C-11), 123.3 (C-9), 122.6 (C-10), 115.4 (C-18), 111.6 (C-16), 109.3 (C-12), 75.0 (C-3), 58.7 (C-OCH_3), 56.6 (C-7), 54.8 (C-5), 51.2 (C-$COOCH_3$), 42.6 (C-20), 34.7 (C-6), 28.8 (C-14)。以上数据与文献（Chen et al., 2009）对照基本一致，故鉴定该化合物为去氢钩藤碱。

化合物 **5**：棕色粉末，以碘化铋钾显色，呈阳性反应。ESI-MS *m/z*: 373 $[M+Na]^+$, ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 9.38 (1H, s, H-21), 8.02 (1H, s, H-1), 7.68 (1H, s, H-17), 7.49 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-10), 7.31 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-11), 7.20–7.09 (2H, m, H-9, 12), 6.68 (1H, q, *J* = 7.3 Hz, H-19), 4.48 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-3), 4.02 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, H-15), 3.65 (3H, s, OCH_3), 2.93 (1H, m, H-6α), 2.82 (1H, d, H-6β), 2.17 (1H, d, H-14α), 2.10 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, H-18), 1.93 (1H, m, H-14β)。^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C：195.9 (C-21), 168.3 (C-228), 152.9 (C-19), 147.4 (C-17), 146.4 (C-16), 136.2 (C-13),132.4 (C-2), 126.8 (C-8), 122.1 (C-9), 119.8 (C-12), 118.1 (C-10), 111.0 (C-10), 108.4 (C-7), 94.1 (C-20), 51.1 (C-5), 50.7 (OCH_3), 49.3 (C-3), 34.1 (C-14), 28.3 (C-15), 22.0 (C-6), 15.1 (q, C-18)。以上数据与文献（田丽娜等, 2014）对照基本一致，故鉴定该化合物为 Vallesiachotamine。

化合物 **6**：白色粉末，以碘化铋钾显色，呈阳性反应。ESI-MS *m/z*: 393 $[M + Na]^+$, ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 8.23 (1H, s, NH-1), 7.46（1H, s, H-9）, 7.18 (1H, td, *J* = 7.7, 1.2 Hz, H-11), 7.04 (1H, t, *J* = 6.1 Hz, H-10), 6.87 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-5a), 3.35 (1H, dd, *J* = 10.8, 3.6 Hz, H-12b), 3.30 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, H-5b), 0.83 (1H, t, *J*=7.1 Hz, H-18)。^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 134.0 (C-8), 109.2 (C-12), 72.4 (C-3), 58.2 (C-21), 56.8 (C-7) , 35.5 (C-6)。以上数据与文献(Chou et al., 2009)对照基本一致，故鉴定该化合物为异钩藤碱。

化合物 **7**：白色粉末，以碘化铋钾显色，呈阳性反应。ESI-MS *m/z*: 385 $[M + H]^+$, ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 8.46 (1H, s, NH-1), 7.27 (1H, s, H-9), 7.17 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-11), 7.04 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-10), 6.90 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-12), 3.72 (3H, s, OCH_3), 3.62 (3H, s, $COOCH_3$), 2.44 (1H, dd, *J* = 17.1, 8.4 Hz, H-5a), 2.02 (1H, dd, *J*=12.6, 7.1Hz, H-6a), 1.66 (1H, t, *J*=10.4 Hz, H-21a), 0.82（3H, t, *J* = 7.2Hz, H-18)。^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 181.5 (C-2), 159.8 (C-17), 140.9 (C-13), 133.8 (C-8),127.7 (C-11), 123.1 (C-10), 109.3 (C-12), 58.2 (C-21), 56.0 (C-7), 55.0 (C-5), 37.8 (C-15), 34.8 (C-6), 31.9 (C-14), 24.2 (C-19), 11.3 (C-18)。以上数据与文献（孙安盛等, 1995）对照基本一致，故鉴定该化合物为钩藤碱。

化合物 **8**：白色颗粒状结晶。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.64 (2H, dd, *J* = 11.2, 6.4 Hz, CH_2OH) , 1.56 (2H, m, CH_2CH_2OH), 1.27 (50H, m), 0.88 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH_3)。^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 63.1 (C-1), 32.8 (C-2), 31.9 (C-26), 29.7 (C-3, 25), 25.7 (C-3), 22.7 (C-27), 14.1 (C-28)。以上数据与文献（蒋艳芳和徐慧, 2011）对照基本一致，故鉴定该化合物为二十八烷醇。

化合物 **9**：无色晶体。ESI-MS: m/z 415 $[M + H]^+$, ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 5. 40 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 3.57 (1H, m, H-3), 1.06 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, d, *J* = 6.

2Hz,H-21), 0.73 (3H, s, H-18). ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.1 (C-14), 56.1 (C-17), 50.1 (C-9), 42.3 (C-4, 13), 39.8 (C-12), 37.3 (C-1), 36.5(C-10), 36.1 (C-20), 34.0 (C-22), 32.0 (C-7), 31.7 (C-8), 29.7 (C-2), 29.2 (C-25), 28.2 (C-16), 26.1 (C-23), 24.3 (C-15), 23.1 (C-28), 21.1 (C-11), 19.8 (C-19), 19.4 (C-27), 19.0 (C-26),18.8 (C-21), 12.0 (C-18, 29)。以上数据与文献（王晓靓, 2014）对照基本一致，故鉴定该化合物为β-谷甾醇。

化合物 **10**：白色无定形晶体。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 2.39 (2H, t, J = 7.3Hz, 29-CH_2), 1.65 (2H , m, J = 4.8 Hz, 28-CH_2), 1.30 (52H , s, 2–27-CH_2), 0.93 (3H, t, J = 6.3 Hz, -CH_3)。^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 33.8 (C-2), 31.6 (C-3), 29.7 (C-4–27), 24.7 (C-28), 22.7 (C-29), 14.1 (C-30)。以上数据与文献（张恒和饶坤林, 2016）对照基本一致，故鉴定该化合物为三十烷酸。

化合物 **11**：白色针晶。ESI-MS m/z: 353 [M - H]$^-$, ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 12.86 (1H, s, 5-OH), 6.68 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-8), 6.45 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-6), 6.29 (1H, s, H-3), 5.11 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-1″), 2.42 (3H, s, CH_3)。^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 182.5 (C-4), 168.9 (C-9), 163.3 (C-7), 161.6 (C-5), 157.9 (C-2), 108.8 (C-3), 105.5 (C-10), 99.9 (C-6), 94.9 (C-8), 77.6 (C-3′), 76.8 (C-5′), 73.5 (C-2′), 70.0 (C-4′), 61.0 (C-6′)。以上数据与文献（郭星和曾常青, 2010）对照基本一致，故鉴定该化合物为 2-methyl-5,7-dihydroxy-chromone-7-*O*-*β*-D-glucopyranoside。

化合物 **12**：白色粉末。ESI-MS *m/z*: 455 [M - H]$^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 5.30 (1H, t, J = 3.5 Hz, H-12), 3.24 (1H, dd, J = 11.3, 4.2 Hz, H-3), 2.84 (1H, dd, J = 13.8, 4.2 Hz, H-18), 1.15 (3H, s), 1.01 (3H, s), 0.95 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.92 (3H, s), 0.79 (3H, s), 0.77 (3H, s)。^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 183.2 (C-28), 143.6 (C-13), 122.6 (C-12), 79.1 (C-3), 55.2 (C-5), 47.6 (C-9), 46.5 (C-17), 45.9 (C-19), 41.6 (C-14), 41.0 (C-18), 39.3 (C-8), 38.8 (C-4), 38.4 (C-1), 37.1 (C-10), 33.8 (C-21), 33.1 (C-7), 32.6 (C-22), 32.4(C-29), 30.7 (C-20), 28.1 (C-23), 27.7 (C-15), 27.2 (C-2), 26.0 (C-27), 23.6 (C-11), 23.4 (C-30), 22.9 (C-16), 18.3 (C-6), 17.1 (C-26), 15.6 (C-24), 15.3 (C-25)。以上数据与文献（刘清华和葛尔宁, 2010）对照基本一致，故鉴定该化合物为齐墩果酸。

化合物 **13**: 黄色粉末。ESI-MS *m/z*: 301 [M - H]$^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, MeOD) δ_H: 7.75 (1H , d, J = 2.1 Hz, H-2′), 7.65 (1H, dd, J = 8.5, 2.2 Hz, H-6′), 6.90 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5′), 6.41 (1H, d, 2.1 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6)。^{13}C-NMR (150 MHz, MeOD) δ_C: 175.9 (C-4), 164.2 (C-7), 161.1 (C-5), 156.8 (C-9), 147.4 (C-2), 146.6 (C-4′), 144.8 (C-2′), 135.8 (C-3), 122.7 (C-1′), 120.27 (C-6′), 114.82 (C-5′), 114.59 (C-2′), 103.11 (C-10), 97.83 (C-6), 93.01 (C-8)。以上数据与文献（许彦, 2003）对照基本一致，故鉴定该化合物为槲皮素。

化合物 **14**：白色粉末。ESI-MS *m/z*: 471 [M - H]$^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 4.17 (1H, d, J = 4.9 Hz, H-3), 3.07 (1H, dd, J = 10.3, 3.4 Hz, H-3), 2.74 (1H, dd, J = 13.8, 4.1 Hz, H-18), 1.10 (3H, s, Me), 0.72 (3H, s, Me), 0.53 (3H, s, Me)。^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 179.1 (C-28), 144.3 (C-13), 122.0 (C-12), 70.7 (C-3), 64.9 (C-23), 47.6 (C-5), 46.8 (C-9), 45.9 (C-19), 42.3 (C-14), 41.8 (C-18), 41.3 (C-4), 38.4 (C-1), 36.8 (C-10), 33.8 (C-21), 33.3 (C-29), 32.6 (C-7), 32.5 (C-22), 30.9 (C-20), 27.7 (C-15), 26.1 (C-2), 23.9 (C-30), 23.4 (C-16), 23.1 (C-11), 17.9 (C-6), 17.4 (C-26), 16.0 (C-25), 13.1 (C-24)。以上数据与文献（刘小梅等, 2001）对照基本一致，故鉴定该化合物为常春藤苷元。

化合物 **15**: 黄色粉末。ESI-MS *m/z*: 285 [M - H]$^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, MeOD) δ_H: 8.10 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2′,6′), 6.92 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3′, 5′), 6.41 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6)。^{13}C-NMR (150 MHz, MeOD) δ_C: 176.0 (C-4), 164.2 (C-7), 161.1 (C-9), 159.2

(C-4′), 156.9 (C-5), 146.6 (C-2), 135.7 (C-3), 129.3 (C-2′, 6′), 122.3 (C-1′), 114.9 (C-2), 103.1 (C-10), 97.9 (C-6), 93.1 (C-8)。以上数据与文献（刘兴文等, 2003）对照基本一致，故鉴定该化合物为山柰酚。

化合物 **16**：白色固体。ESI-MS m/z: 247 $[M + Na]^+$, ^{1}H-NMR (600 MHz, MeOD) δ_H: 5.84 (1H, s, H-1), 3.72 (1H, dd, *J* = 12.3, 6.2 Hz, H-9), 2.48 (1H, d, *J* = 17.4 Hz, H-4 a), 2.07 (3H, d, *J* = 1.1 Hz, H-13), 2.03 (1H, d, *J* = 14.4 Hz, H-4b), 1.98 (1H, m, H-6), 1.94 (1H, m, H-7a), 1.55 (2H, m, H-8), 1.46 (1H, m, H-7b), 1.19 (3H, d, *J* = 6.2Hz, H -10), 1.12 (3H, s, H-11), 1.05 (3H, s, H-12)。^{13}C-NMR (150 MHz, MeOD) δ_C: 200.8 (C-3), 168.3 (C-5), 124.0 (C-4), 67.2 (C-2), 51.0 (C-6), 46.7 (C-2), 38.4 (C-8), 35.9 (C-1), 2 7.6 (C-12), 26.1 (C-11), 25.8 (C-7), 23.5 (C-13), 22.2 (C-10)。以上数据与文献（Wang et al., 2018） 对照基本一致，故鉴定该化合物为 (6R, 9R)-9-hydroxymegastigman-4-en-3-one。

化合物 **17**： 白色粉末。ESI-MS *m/z*: 455 $[M - H]^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H: 5.27 (1H, s, H-12), 3.08 (1H, dd, *J* = 11.7, 4.2 Hz, H-3), 2.22 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-18)。^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C: 138.9 (C-13), 127.25 (C-12), 80.1 (C-3), 57.0 (C-5), 54.4 (C-18), 43.7 (C-9, 7), 40.7 (C-14), 40.6 (C-8), 40.4 (C-4), 39.9 (C-19), 38.2 (C-1), 31.8 (C-7), 30.7 (C-21), 29.2 (C-10), 28.5 (C-15, 23), 25.4 (C-2), 24.3 (C-16), 24.1 (C-11), 21.6 (C-30), 19.1 (C-6), 17.6 (C-26), 17.4 (C-29)。以上数据与文献（薛梅等, 2004）对照基本一致，故鉴定该化合物为熊果酸。

化合物 **18**：白色粉末。ESI-MS *m/z*: 289 $[M - H]^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, MeOD) δ_H: 6.97 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2′), 6.80 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, H-5′), 6.76 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H -6′), 5.94 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 5.92 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 4.18 (1H, s, H-3), 2.86 (1H, dd, *J* = 16.7, 4.4 Hz, H-4), 2.74 (1H, dd, *J* = 16.7, 2.4 Hz, H-4)。^{13}C- NMR (150 MHz, $CDCl_3$) $\delta_{C:}$ 158.0 (C-5), 157.6 (C-7), 157.4 (C-9), l45.9 (C-3′), l45.7 (C-4′), 132.3 (C-1′), 119.4 (C-6′), 115.8 (C-2′), 115.3 (C-5′), l00.1 (C-10), 96.4 (C-6), 95.9(C-8), 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.2 (C-4)。以上数据与文献（徐东升等, 2015）对照基本一致，故鉴定该化合物为表儿茶素。

化合物 **19**：橙黄色粉末。ESI-MS m/z: 283 $[M - H]^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 12.32 (1H, s, 8-OH), 12.13 (1H, s, 1-OH), 7.64 (1H, s, H-4), 7.38 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 7.10 (1H, s, H-2), 6.70 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-7), 3.96 (3H, s, OCH_3), 2.47 (3H, s, CH_3)。^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 190.8 (C-9), 182.0 (C-10), 166.5 (C-1), 165.2 (C-8), 162.5 (C-3), 148.4 (C-6), 135.2 (C-4a), 133.2 (C-10a), 124.5 (C-7), 121.3 (C-5), 113.7 (C-9a), 110.3 (C-8a), 108.2 (C-2), 106.8 (C-4), 56.1 (OCH_3), 22.2 (CH_3)。以上数据与文献（Huang et al., 2016）对照基本一致，故鉴定该化合物为大黄素甲醚。

图 1 化合物 **1-19** 的结构式

Fig 1 Chemical structures of compounds **1-19**

2.2 抗肿瘤活性实验结果

化合物 **3** 和 **5** 对人白血病细胞（HEL）、（K562）的抗肿瘤活性实验结果如表 1 所示。结果表明，化合物 **3** 对人白血病细胞（HEL）有较强的抑制作用，其 IC_{50} 为 17.96 μg mL^{-1}，然而对人白血病细胞（K562）没有抑制作用。化合物 **5** 对人白血病细胞（K562）的抑制作用较强，IC_{50} 为 16.45 μg mL^{-1}，对人白血病细胞（HEL）显示有较弱的抑制作用。

表 1 化合物对白血病细胞株 HEL、K562 的增殖抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of compounds on proliferation of leukemia cell line HEL, K562

化合物	IC_{50} (μg mL^{-1})

Chemical compound	HEL	K562
3	17.96±2.78	—
5	73.01±3.35	16.45±3.15
阿霉素 Adriacin	6.64±0.98	3.79±0.82
长春新碱 Leurocristine	5.97±0.94	4.28±0.99
紫杉醇 Paclitaxel	10.89±1.35	5.65±0.84
5-氟尿嘧啶 5-fluorouracil	13.98±2.50	8.49±1.21
顺铂 Cisplatin	7.90±0.85	9.47±2.12

注: "—" 表示未检测到该化合物具有活性。

Note: "—" indicates that the compound was not detected to be active.

3 讨论

贵州作为中国四大药材的主产区之一，其独特的地理环境和气候特征造就了丰富而独特的中药和民族药资源，贵州民族道地药材钩藤是抗肿瘤的重要药材，虽然钩藤入药部位为带钩茎枝，但是其占整个药材的比例较低，资源浪费较为严重。近来研究显示，钩藤非药用部位的化学成分与药用部位成分相似，课题组前期利用 HPLC 测定了黔产钩藤不同药用部位钩藤碱和异钩藤碱的含量。基于前期基础，本研究对钩藤非药用部位茎和叶进行化学成分的分离和纯化，从中分离得到 19 个化合物，运用核磁、质谱等波谱技术进行了结构鉴定，其中，化合物 **1**, **8**, **10**, **16** 为首次从钩藤植物中分离得到。同时，采用 MTT 法对化合物 **3** 和 **5** 进行了抗肿瘤活性筛选，实验结果显示，化合物 **3** 对人白血病细胞（HEL）有较强的抑制作用，其 IC_{50} 为 17.96 μg mL^{-1}，然而对人白血病细胞（K562）没有抑制作用。化合物 **5** 对人白血病细胞（K562）的抑制作用较强，IC_{50} 为 16.45 μg mL^{-1}，对人白血病细胞（HEL）显示有较弱的抑制作用。尽管化合物 **3** 和 **5** 对人白血病细胞株（K562）和（HEL）2 株癌细胞的增殖抑制作用比阳性对照紫杉醇，阿霉素，长春新碱，顺铂和 5-氟尿嘧啶的抑制作用弱，但从一定角度上表明，钩藤中生物碱类化合物具有抗肿瘤活性，为后续钩藤生物碱类化合物的分离以及活性筛选提供思路。

参考文献：

CAI J, GUO QL, LI RF, et al., 2019. Alkaloids in water extract of *Uncaria rhynchophylla*[J]. Acta Pharm, (6): 1075-1081. [蔡建，郭庆兰，李若斐，2019. 钩藤水提取物中的生物碱类成分[J]. 药学学报, (6): 1075-1081.]

CHEN ZY, PENG C, JIAO R, et al., 2009. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods[J]. J Agric Food Chem, 57(11): 4485-4499.

CHOU CH, GONG CL, CHAO CC, et al., 2009. Rhynchophylline from *Uncaria rhynchophyl*la functionally turns delayed rectifiers into A-Type K^+ channels[J]. J Nat Prod-lloydia, 72(5): 830-834.

DE OLIVEIRA LZ, FARIAS ILUIZA, RIGO ML, et al.，2014. Effect of *Uncaria tomentosa* extract on apoptosis triggered by oxaliplatin exposure on HT29Cells[J]. Evid Based Compl Altern Med.

GAO XY, DING R, YI P, et al., 2017. Profiling on the invention patents of *Uncaria rhynchophylla* in China[J]. Wor Sic Tec Mod Trad Chin Med Mat Med, 19(1): 178-18

GUO X, ZENG CQ, 2010. Determination of rhynchophylline and isorhynchophylline in *Uncaria rhynchophylla* from different habitats by HPLC[J]. Henan Trad Chin Med, (1): 40-41. [郭星, 曾常青, 2010. HPLC 法测定不同产地钩藤中异钩藤碱和钩藤碱的含量[J]. 河南中医, (1): 40-41.]

HUANG YY, LIU LF, YUE RQ, et al., 2016. Full component analysis of Tianma-Gouteng-Yin[J]. Chin Med, 11(1): 44.

JIANG YF, XU H, 2011. Determination of rhynchophylline and isorhynchophylline in *Uncaria rhynchophylla* by UPLC[J]. Chin J Trad Chin Med Pharm, 26(9): 2119-2121. [蒋艳芳, 徐慧, 2011. 超高效液相色谱法测定钩藤中的钩藤碱和异钩藤碱的含量[J].中华中医药杂志, 26(9): 2119-2121.]

KIM KS, PHAM TNN, JIN CJ, et al., 2011. Uncarinic acid C isolated from *Uncaria rhynchophylla* induces differentiation of Th1-promoting dendritic cells through TLR4 signaling[J]. Biomarker Insights, (6): 27-38.

LIU QH, GE EN, 2010. RP-HPLC method measure the contents and the regularity in Ramulus Uncariae Cum Uncis[J]. J Zhejiang Univ Trad Chin Med, 34(2): 270-270. [刘清华, 葛尔宁, 2010. RP-HPLC 法测定钩藤煎剂中钩藤碱含量及变化[J]. 浙江中医药大学学报, 34(2): 270-270.]

LIU XM, ZHANG ZJ, ZHU Y, 2001. Thin-layer chromatographic scanning determination rhynchophylline content in Fufangtianmapian[J]. Chem Ind Times, 15(3): 45-47. [刘小梅, 张正兢, 朱彦, 2001. 薄层扫描法测定降压药复方天麻片中钩藤碱的含量[J]. 化工时刊, 15(3): 45-47.]

LIU XW, MEI J, YANG XD, 2003. Study on differentiations and content determination of Qianyang Jiangya capsule[J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 14(9): 543-544. [刘兴文, 梅娇, 杨晓东, 2003. 潜阳降压胶囊的鉴别及含量测定研究[J]. 时珍国医国药, 14(9): 543-544.]

MA Y, DING Z, QIAN Y, et al., 2009. An integrative genomic and proteomic approach to chemosensitivity prediction[J]. Int J Oncol, 34(1): 107-115.

SUN AS, YU LM, LIU GX, 1995. The effect of rhynchophylline on the action potential of the sciatic nerve and the electrocardiogram in rats[J]. Acta Acad Med Zunyi, 18(1): 11-13. [孙安盛, 余丽梅, 刘国雄, 1995. 钩藤碱对蟾蜍坐骨神经动作电位和大鼠心电图的影响[J]. 遵义医学院学报, 18(1):11-13.]

THE NATIONAL PHARMCCOPEIA COMMISSION, 2015. Pharmacopoeia of the people's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, I:340. [国家药典委员会, 2015 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, I:340.]

WANG D, MU Y, DONG H, et al., 2018. Chemical constituents of the ethyl acetate extract from diaphragma juglandis fructus and their inhibitory activity on nitric oxide production *in vitro*[J]. Molecules, 23(1): 72.

WANG XL, 2014. Determination of rhynchophylline and isorhynchophylline in *Uncaria rhynchophylla* by UPLC[J]. Heilongjiang Med, 38(1): 64-65. [王晓靓, 2014. RP-HPLC 法测定钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量[J]. 黑龙江医学, 38(1): 64-65.]

WANG ZJ, SUN WK, 2010. Progress in research on chemical composition and pharmacological effects of *Uncaria rhynchophylla*[J]. Mod Enter Ed, 371(24): 197-198.]

XU DS, GAO YM, YANG C, et al., 2015. Study on the determination of total flavonoids in *Tripterygium wilfordii*[J]. Stud Trace Elem Health, 32(1): 29-30. [徐东升, 高言明, 杨春, 2015. 钩藤总黄酮含量测定研究[J]. 微量元素与健康研究, 32(1): 29-30.]

XU Y, 2003. Determination of hotenine in compound Gongteng tablets by thin layer scanning[J]. Chin J Trad Med Sci Technol, 10(6): 359-360. [许彦, 2003. 薄层扫描法测定复方钩藤片中钩藤碱的含量[J]. 中国中医药科技, 10(6): 359-360.]

XUE M, HUANG GQ, YAN YJ, et al., 2004. Extraction and determination of Total flavonoids from *Tripterygium wilfordii*[J]. Nei Mongol J Trad Chin Med, 23(1): 29-29. [薛梅, 黄国强, 闫豫君, 2004. 钩藤中总黄酮的提取及含量测定[J]. 内蒙古中医药, 23(1): 29-29.]

YANG L, HU X, LI J, 2014. Rhynchophylline and isorhynchophylline content of *Uncaria rhynchophylla* from different producing areas in Guizhou[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 42(10):112-114.

ZHANG H, RAO KL, 2016. Application in prognostic of the extraction and content determination of rhynchophylline and isorhychophylline in Gambir Plant Nod[J]. World Chin Med, 11(7): 338-341. [张恒, 饶坤林, 2016. 钩藤中钩藤碱、异钩藤碱的提取与含量测定在预后中的应用分析[J]. 世界中医药, 11(7)∶338-341.]

ZHANG JG, HUANG XY, MA YB, et al., 2020. UFLC-PDA-MS/MS Profiling of seven *Uncaria* species integrated with Melatonin/5-Hydroxytryptamine receptors Agonistic Assay[J]. Nat Prod Biol, 10(1): 23-36.